

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/02/2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO**

Nathália Alves de Souza Rocha Frigoni

Médica Veterinária

2016

**T
E
S
E**

/

**R
O
C
H
A
-
F
R
I
G
O
N
I**

**N.
A.
S.**

**2
0
1
6**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO**

Nathália Alves de Souza Rocha Frigoni

Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO**

**Nathália Alves de Souza Rocha Frigoni
Orientadora: Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, área de Reprodução Animal

2016

R672e Rocha-Frigoni, Nathália Alves de Souza
Estratégias para minimização do estresse oxidativo em sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos destinados à vitrificação / Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni. – – Jaboticabal, 2016
viii, 101 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti
Banca examinadora: Felipe Perecin, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, Marcos Antonio Rossi Feliciano
Bibliografia

1. Antioxidantes. 2. Apoptose. 3. Espécies reativas de oxigênio. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO.

AUTORA: NATHALIA ALVES DE SOUZA ROCHA FRIGONI

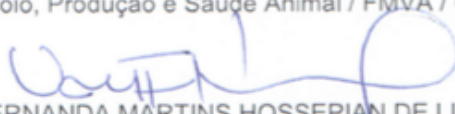
ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA / UNESP - Araçatuba/SP



Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCUS ANTONIO ROSSI FELICIANO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA

Departamento de Ciências Biológicas / FCL / UNESP - Assis/SP



Prof. Dr. FELIPE PERECIN

FZEA/USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nathália Alves de Souza Rocha Frigoni – nascida em Ribeirão Preto-SP, aos 7 dias do mês de Novembro de 1985. Concluiu o ensino médio no Colégio Oswaldo Cruz (COC), na cidade de Ribeirão Preto-SP, em dezembro de 2003. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP Campus Jaboticabal-SP, em março de 2005. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2009. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2010, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado da CNPq. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Doutorado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2012, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado da FAPESP.

EPÍGRAFE

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

DEDICO

Aos meus pais,

Márcio e Beatriz

À minha querida irmã Fernanda

À minha avó Vera Alice (*in memoriam*)

Pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu amor Fabio,

Pela compreensão e companheirismo em todos
os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me fortalece e me mostra os caminhos a seguir.

À Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, pela orientação, amizade, confiança e ensinamentos.

Às minhas amigas e companheiras do laboratório, Beatriz Leão, Priscila Chediek Dall'Acqua e Marcela Ambrogi pela amizade, companheirismo e ensinamentos durante esses anos.

Ao técnico do laboratório, Alexandre Teixeira, pelo auxílio necessário para a realização do experimento e funcionamento do laboratório.

Ao funcionário Adão Custódio por providenciar o material necessário para a realização do experimento.

Às estagiárias que acompanharam e ajudaram na execução do experimento: Luana Rodrigues, Giovana Barros Nunes, Juliana Viegas, Maria Isabela Azeredo.

Aos professores componentes da banca examinadora Prof. Dr. Felipe Perecin, Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano e Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima pelos ensinamentos e contribuições na defesa.

Ao Prof. Dr. Peter James Hansen pela oportunidade de realizar estágio de pesquisa no Laboratório de Produção *in vitro* na Universidade da Flórida, Gainesville, EUA e à toda sua equipe.

À minha família e toda família Frigoni por todo amor e incentivo.

À FAPESP pela bolsa de estudos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal pelas instalações oferecidas para a realização do experimento.

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia da Reprodução (#labfisiorep) que contribuiu de alguma forma para esse trabalho.

A todos, que de alguma forma, contribuíram com incentivo, apoio e confiança para que esse trabalho se tornasse realidade e concluísse a realização de um sonho.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto teve bolsa de estudo concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, sob o processo nº 2012/10083-8.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Introdução.....	1
Objetivo	3
Hipótese	3
Revisão de Literatura.....	3
Espécies reativas de oxigênio, sua relação com o estresse oxidativo e seus efeitos na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	3
Efeito da adição de antioxidantes nos meios de cultivo <i>in vitro</i>	5
Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e seu papel biológico em oócitos e embriões bovinos.....	8
Apoptose.....	9
Criopreservação e criotolerância de embriões PIV.....	10
Referências.....	13
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	20
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	24
Reagentes químicos.....	24
Obtenção de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	24
Separação espermática e fertilização <i>in vitro</i>	25
Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	25

Determinação da taxa de apoptose e avaliação da maturação nuclear.....	26
Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida.....	27
Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína.....	27
Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	28
Análise estatística.....	30
Resultados.....	30
Discussão.....	34
Conclusão.....	40
Referências.....	41

CAPÍTULO 3 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.....

Resumo.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	51
Reagentes químicos.....	51
Obtenção de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	51
Separação espermática e fertilização <i>in vitro</i>	52
Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	52
Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida.....	53
Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína.....	53
Mensuração da atividade das caspases 3 e 7.....	54
Deteção de fragmentação nuclear (coloração “terminal transferase assay”-TUNEL).....	54
Delineamento experimental.....	57
Análise estatística.....	57
Resultados.....	58
Discussão.....	61
Conclusão.....	66

Referências.....	67
------------------	----

CAPÍTULO 4 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM IGF-1 DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE MEBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.....71

Resumo.....	71
Introdução.....	73
Material e Métodos.....	75
Reagentes químicos.....	75
Obtenção de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	76
Separação espermática e fertilização <i>in vitro</i>	76
Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	77
Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida.....	77
Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína.....	78
Mensuração da atividade das caspases 3 e 7.....	78
Detecção de fragmentação nuclear (coloração “terminal transferase assay”-TUNEL).....	79
Vitrificação e aquecimento dos embriões.....	80
Extração do RNA total e reação de transcrição reversa.....	80
Expressão gênica por qPCR.....	81
Delineamento experimental.....	83
Análise estatística.....	83
Resultados.....	84
Discussão.....	89
Conclusão.....	95
Referências.....	96

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....101

ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO

RESUMO – O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes estratégias para minimizar os efeitos do estresse oxidativo induzido pela menadiona durante o cultivo *in vitro* sobre o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Para tanto, no Experimento I, os oócitos foram MIV em meio suplementado com 0,6 mM de cisteína e 100 μ M de cisteamina (C+C), 100 UI de catalase (CAT), 0,6 mM de cisteína associado à 100 μ M de cisteamina e 100 UI de catalase (C+C+CAT), ou sem a suplementação com antioxidantes (Controle). Posteriormente, foram fecundados e os prováveis zigotos cultivados *in vitro* durante 7 dias. Oócitos imaturos (0h) e após 22 h de MIV foram avaliados quanto ao conteúdo intracelular de ROS e de GSH, potencial de membrana mitocondrial, maturação nuclear e ocorrência de apoptose. No Experimento II, oócitos foram MIV em meio suplementado com C+C+CAT (ATX) e os prováveis zigotos foram CIV em meio SOF. Do Dia 6 até o final do CIV os embriões foram cultivados na presença ou ausência de 5 μ M de menadiona (MD). No dia 7 foi avaliada a taxa de blastocistos e os mesmos destinados às avaliações quanto ao conteúdo intracelular de ROS e GSH, atividade de caspases 3 e 7 e ocorrência de apoptose. Por fim, no Experimento III, oócitos foram MIV e os prováveis zigotos foram CIV em meio SOF suplementado com 100 ng/mL de IGF-I (IGF). Do Dia 6 até o final do CIV os embriões foram cultivados na presença ou ausência de 5 μ M de menadiona (MD). No dia 7 foi avaliada a taxa de blastocistos e os mesmos foram destinados às avaliações previamente descritas no Experimento II além da avaliação da taxa de re-expansão após vitrificação/aquecimento e expressão dos genes CASP3, GPX-1 e SOD-1. No experimento I, a taxa de maturação nuclear não foi afetada pelos tratamentos ($P > 0,05$). A porcentagem de apoptose do grupo C+C+CAT foi superior ($P < 0,05$) ao grupo CAT, porém os grupos Controle e C+C não diferiram dos demais ($P > 0,05$). O conteúdo intracelular de ROS nos grupos C+C e C+C+CAT foi semelhante ao observado em oócitos imaturos (0h), e o maior ($P < 0,05$) nível de ROS foi encontrado no grupo Controle. O conteúdo intracelular de GSH foi reduzido ($P < 0,05$) em todos os grupos quando comparados aos oócitos imaturos, no entanto os grupos Controle, CAT e C+C+CAT apresentaram menores ($P < 0,05$) concentrações de GSH quando comparado ao grupo C+C. O potencial de membrana mitocondrial aumentou em todos os grupos ($P < 0,05$) comparado com os oócitos imaturos (0h), com exceção do grupo C+C. A taxa de blastocistos foi maior ($P < 0,05$) no grupo C+C+CAT comparada aos demais grupos. No experimento II, o conteúdo intracelular de GSH foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. O conteúdo intracelular de ROS encontrado no grupo MD foi superior ($P < 0,05$) aos observados nos grupos Controle e Controle ATX, já o grupo ATX MD não diferiu ($P > 0,05$) dos grupos anteriormente mencionados. A atividade de caspases não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos. No entanto, as porcentagens de apoptose encontradas nos grupos MD e ATX MD foram superiores ($P < 0,05$) comparadas aos grupos Controle e Controle ATX. A taxa de blastocisto foi menor ($P < 0,05$) no grupo MD comparados aos grupos Controle e Controle ATX, porém o grupo ATX MD não diferiu ($P > 0,05$) dos demais grupos experimentais. No experimento III, o conteúdo intracelular de GSH foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos

experimentais. O conteúdo intracelular de ROS encontrado no grupo MD foi superior ($P < 0,05$) ao observado no grupo Controle, já os grupos IGF e IGF MD não diferiram ($P > 0,05$) dos grupos anteriormente mencionados. Com relação à atividade de caspases 3 e 7 não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos. O número total de blastômeros não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. No entanto, as maiores porcentagens de apoptose foram encontradas no grupo MD e foram superiores ($P < 0,05$) aos grupos Controle, IGF e IGF MD. Níveis intermediários de porcentagem de apoptose foram encontrados nos grupos Controle e IGF MD, que não diferiram entre si ($P > 0,05$), porém tais grupos foram superiores ($P < 0,05$) comparado ao grupo IGF, que apresentou as menores porcentagens ($P < 0,05$). A taxa de blastocisto foi menor ($P < 0,05$) no grupo MD comparados aos grupos Controle e IGF, porém o grupo IGF MD não diferiu ($P > 0,05$) dos demais grupos experimentais. A taxa de re-expansão foi inferior ($P < 0,05$) no grupo MD comparada aos grupos Controle e IGF, que não diferiram entre si ($P > 0,05$). O grupo IGF MD não diferiu ($P > 0,05$) dos grupos IGF e MD, porém foi inferior ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo Controle. Não houve diferença ($P > 0,05$) na expressão relativa dos genes CASP3 e GPX-1 entre os grupos experimentais. No entanto, a expressão do gene SOD-1 foi maior ($P < 0,05$) no grupo IGF MD comparado ao grupo IGF, porém estes grupos não diferiram ($P > 0,05$) dos grupos Controle e MD. Em conclusão, a suplementação com antioxidantes intra- e extracelulares durante a MIV melhorou a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário e minimizou os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido pela menadiona. Ainda, a adição de IGF-1 durante o CIV aumentou a resistência ao estresse oxidativo induzido pela menadiona, visto que aumentou a expressão do gene antioxidante SOD-1, o que resultou em redução da apoptose e melhorou o desenvolvimento e criotolerância de blastocistos bovinos.

Palavras-chave: antioxidantes, apoptose, espécies reativas de oxigênio

STRATEGIES FOR MINIMIZING OXIDATIVE STRESS IN IN VITRO PRODUCTION SYSTEM OF BOVINE EMBRYOS DESTINED FOR VITRIFICATION

ABSTRACT - The study aimed to evaluate different strategies to minimize the effects of oxidative stress induced by menadione during *in vitro* culture on the potential for *in vitro* embryonic development. Therefore, in Experiment I, the oocytes were IVM in medium supplemented with 0.6 mM cysteine and 100 mM cysteamine (C+C), 100 IU catalase (CAT), 0.6 mM cysteine associated with 100 uM cysteamine and 100 IU catalase (C+C+CAT) or without antioxidants supplementation (Control). Then, were fertilized and the presumptive zygotes were *in vitro* cultured for 7 days. Immature oocytes (0h) and oocytes after 22 h of IVM were evaluated for intracellular levels of GSH and ROS, mitochondrial membrane potential, nuclear maturation and apoptosis. In Experiment II, oocytes were IVM in medium supplemented with C+C+CAT (ATX) and the presumptive zygotes were IVC in SOF medium. From Day 6 to the end of the IVC, embryos were cultured in the presence or absence of 5 uM menadione (MD). On day 7, embryo development to the blastocyst rate was evaluated. Blastocysts were subjected to evaluations for intracellular GSH and ROS content, caspases 3 and 7 activity and apoptosis. Finally, Experiment III, oocytes were IVM and the presumptive zygotes were IVC in SOF medium supplemented with 100 ng/mL IGF-I (IGF). From Day 6 to the end of the IVC, embryos were cultured in the presence or absence of 5 uM menadione (MD). On day 7, embryo development to the blastocyst rate was evaluated. Blastocysts were subjected to evaluations for intracellular GSH and ROS content, caspases 3 and 7 activity, apoptosis, re-expansion rates after vitrification/thawing and expression of CASP3, GPX-1 and SOD-1 genes. In the first experiment, nuclear maturation rate was not affected by treatments ($P>0.05$). The percentage of apoptosis in C+C+CAT group was higher ($P<0.05$) compared to CAT group, but the Control and C+C groups did not differ from other groups ($P>0.05$). Intracellular ROS levels in C+C and C+C+CAT groups were similar to that observed in immature oocytes (0h) and higher ($P<0.05$) ROS levels were found in Control group. The intracellular GSH stocks was reduced ($P<0.05$) in all groups compared to immature oocytes, however the Control, CAT and C+C+CAT groups had lower ($P<0.05$) GSH concentrations compared to C+C group. The mitochondrial membrane potential was increased in all groups ($P<0.05$) when compared to immature oocytes (0h), with the only exception of C+C group. The blastocyst rate was higher ($P<0.05$) in the C+C+CAT group compared to the other groups. In the second experiment, the intracellular GSH levels was similar ($P>0.05$) between the experimental groups. The intracellular ROS levels found in the MD group was higher ($P<0.05$) than Control and Control ATX groups, ATX MD group did not differ ($P>0.05$) from the groups mentioned above. The caspases 3 and 7 activity did not differ ($P>0.05$) between groups. However, the percentage of apoptosis found in MD and MD ATX groups were higher ($P<0.05$) compared to Control and Control ATX groups. The blastocyst rate was lower ($P<0.05$) in the MD group compared to Control and Control ATX groups, but the ATX MD group did not differ ($P>0.05$) from the other experimental groups. In Experiment III, the intracellular GSH levels was similar ($P>0.05$) between the experimental groups. The intracellular ROS levels found in the MD group was higher ($P<0.05$) than observed in the Control group,

however IGF and IGF MD groups did not differ ($P>0.05$) from the groups mentioned above. Caspases 3 and 7 activity and the total number of blastomeres did not differ ($P>0.05$) between experimental groups. However, the highest apoptotic percentages were found in the MD group and were higher ($P<0.05$) than Control, IGF and IGF MD groups. Intermediate apoptosis percentage levels were found in Control and IGF MD groups, which did not differ ($P>0.05$), but these groups were higher ($P<0.05$) compared to IGF group, which had the lowest percentages ($P<0.05$). The blastocyst rate was lower ($P<0.05$) in the MD group compared to Control and IGF groups, but IGF MD group did not differ ($P>0.05$) from the other experimental groups. The re-expansion rates was lower ($P<0.05$) in the MD group compared to Control and IGF groups, which did not differ ($P>0.05$). The IGF MD group did not differ ($P>0.05$) of the IGF and MD groups, but was lower ($P<0.05$) when compared to the Control group. There was no difference ($P>0.05$) in the relative expression of CASP3 and GPX-1 genes between experimental groups. However, expression of the SOD-1 gene was higher ($P<0.05$) in the IGF MD compared to IGF group, however these groups did not differ ($P>0.05$) from Control and MD groups. In conclusion, supplementation with intra- and extracellular antioxidants during IVM improved oocyte competence for embryonic development and minimized the deleterious effects of oxidative stress induced by menadione. Furthermore, the addition of IGF-1 for the IVC increased resistance to oxidative stress induced by menadione, whereas increased the expression of the antioxidant gene SOD-1, which resulted in reduction of apoptosis and improvement of blastocyst development and cryotolerance.

Keywords: antioxidants, apoptosis, reactive oxygen species

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	
Tabela 1 - Fase da maturação nuclear e ocorrência de apoptose em oócitos bovinos MIV em meio suplementado com diferentes antioxidante.....	31
CAPÍTULO 3 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	
Tabela 1 - Número total de células e porcentagem de apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i> e submetidos ao estresse oxidativo e oriundos de oócitos maturados <i>in vitro</i> na presença de antioxidantes.....	60
CAPÍTULO 4 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM IGF-1 DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	
Tabela 1 - Número total de células e porcentagem de apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i> e submetidos ao estresse oxidativo e oriundos de oócitos maturados <i>in vitro</i> na presença de antioxidantes.....	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	
Figura 1 - Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente ThiolTracker Violet para detecção da glutathione (GSH) intracelular (A); com a sonda fluorescente H ₂ DCFDA para detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares (B); com a sonda fluorescente MitoTracker Red para avaliação do potencial de membrana mitocondrial (C); com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para a identificação do material nuclear (em azul, D); e ensaio TUNEL para a determinação da fragmentação nuclear (em verde, E). Os oócitos foram avaliados em microscopia de epifluorescência (ver no texto o detalhamento dos filtros utilizados para cada sonda). Aumento 20 X.....	29
Figura 2 - Concentrações intracelulares de GSH (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com antioxidantes.....	31
Figura 3 - Concentrações intracelulares de ROS (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com antioxidantes.....	32
Figura 4 - Potencial de membrana mitocondrial (quantificado em unidades arbitrárias de fluorescência) de oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com antioxidantes.....	33
Figura 5 - Efeito da suplementação com diferentes antioxidantes durante a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos sobre as taxas de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos.....	34
CAPÍTULO 3 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	

Figura 1 - Imagem ilustrativa de embriões bovinos corados com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para a identificação dos núcleos e contagem do número total de blastômeros (em azul, A); ensaio TUNEL para detecção das células em apoptose (em verde, B); sobreposição das imagens (C); embriões corados com a sonda fluorescente ThiolTracker Violet para detecção da glutathione (GSH) intracelular (D); embriões corados com a sonda fluorescente H₂DCFDA para detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares (E); e embriões corados com a sonda fluorescente FLICA para mensuração da atividade de caspases 3 e 7 (F). Os embriões foram avaliados em microscopia de epifluorescência (ver no texto o detalhamento dos filtros utilizados para cada sonda). Aumento 20 X.....56

Figura 2 - Concentrações intracelulares de GSH (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* na presença ou ausência de menadiona e oriundos de oócitos maturados *in vitro* com antioxidantes.....58

Figura 3 - Concentrações intracelulares de ROS (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* na presença ou ausência de menadiona e oriundos de oócitos maturados *in vitro* com antioxidantes.....59

Figura 4 - Atividade das caspases 3 e 7 (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* na presença ou ausência de menadiona e oriundos de oócitos maturados *in vitro* com antioxidantes.....60

Figura 5 - Taxa de clivagem e blastocistos obtidas à partir de oócitos maturados *in vitro* na presença ou não de antioxidante e dos embriões cultivados *in vitro* na presença ou ausência de menadiona (MD).....61

CAPÍTULO 4 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM IGF-1 DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Figura 1 - Concentrações intracelulares de GSH (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....84

Figura 2 - Concentrações intracelulares de ROS (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	85
Figura 3 - Atividade das caspases 3 e 7 (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	86
Figura 4 - Taxa de clivagem e blastocistos obtidas de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	87
Figura 5 - Taxa de re-expansão após 24 h de recultivo de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	88
Figura 6 - Expressão relativa dos genes caspase 3 (CASP3), glutathione peroxidase 1 (GPX-1) e superóxido dismutase 1 (SOD-1) em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	89

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A biotécnica de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é amplamente empregada, com finalidades de pesquisa e comercial, porém tais embriões apresentam pior qualidade e competência de desenvolvimento em comparação com os obtidos *in vivo*. Ainda, embriões PIV são mais sensíveis às baixas temperaturas e possuem criotolerância inferior quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (IMAI *et al.*, 2002). Isso ocorre devido ao aumento na concentração lipídica de embriões durante o cultivo *in vitro* (CIV), em decorrência da inclusão de certos componentes no meio de cultivo como, por exemplo, o soro fetal. O acúmulo de lipídeos e consequente aumento da peroxidação lipídica causada por espécies reativas de oxigênio (ROS) são, em grande parte, responsáveis por, prejudicar o desenvolvimento e criotolerância de embriões PIV (NEDAMBALE *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos celulares antioxidantes (FEUGANG *et al.*, 2003) e pode acarretar diferentes tipos de injúrias celulares, tais como peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, bem como apoptose. Estes fatores em conjunto podem diminuir a viabilidade embrionária (KITAGAWA *et al.*, 2004), especialmente em embriões PIV que são mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger sua delicada estrutura celular (GOTO *et al.*, 1993).

Para evitar danos induzidos pelo estresse oxidativo no embrião, vários antioxidantes podem ser adicionados aos meios de cultivo *in vitro* para melhorar o desenvolvimento com sucesso variável (ALI *et al.*, 2003). Compostos tiol de baixo peso molecular, como β -mercaptoetanol, cisteína, cistina e cisteamina, são usados como suplementos do meio de maturação de oócitos (DE MATOS *et al.*, 1997; ALI *et al.*, 2003) e de cultivo embrionário (CAAMAÑO *et al.*, 1996; LIM *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 1993). Estes compostos servem como precursores da síntese de

glutathiona (GSH), a qual atua na manutenção do estado redução-oxidação (redox) nas células, protegendo-as contra os danos oxidativos (DELEUZE & GOUDET, 2010) ao promover a detoxificação de peróxidos lipídicos e de proteínas tioladas, bem como a remoção de H_2O_2 em embriões (JOHNSON & NARS-ESFAHANI, 1994). Portanto, o aumento da síntese de GSH durante a maturação pode ser correlacionado com a competência do oócito para o posterior desenvolvimento embrionário inicial e viabilidade pós-criopreservação (FURNUS *et al.*, 2008).

Além da ação protetora de antioxidantes sobre as células em cultivo, uma outra estratégia é a suplementação dos meios de cultivo *in vitro* com antioxidantes enzimáticos extracelulares, como a superóxido dismutase (SOD) ou catalase (ALI *et al.*, 2003), visando a modulação das ROS extracelulares. Embora haja poucos estudos demonstrando os efeitos protetores destes antioxidantes em sistemas de PIV, foi recentemente demonstrado (ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014) que a adição de catalase promoveu redução dos níveis intracelulares de ROS e da taxa de apoptose de embriões bovinos PIV. Desta forma, está claro que a proteção dos embriões PIV contra o estresse oxidativo resulta em aumento nas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*, bem como na qualidade dos embriões obtidos. Todavia, ainda não está bem estabelecido se estes benefícios acarretam em maior criotolerância de tais embriões.

Além dos antioxidantes, outros fatores já demonstraram desempenhar importante papel no desenvolvimento embrionário em condições adversas, como por exemplo, fatores de crescimento. Diversos relatos indicam que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) atua como um fator de sobrevivência ao reduzir os efeitos deletérios sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária quando blastocistos são submetidos a condições adversas, como estresse oxidativo (MOSS *et al.*, 2009; KURZAVA *et al.*, 2002). O IGF-I exerce efeito positivo sobre o desenvolvimento pré-implantacional por estimular o metabolismo e crescimento embrionário, via redução da apoptose e aumento do número total de blastômeros (LOTT *et al.*, 2010).

Está bem elucidado que a proteção dos embriões PIV contra o estresse oxidativo é uma das chaves para o aprimoramento do desenvolvimento embrionário *in vitro* (TAKAHASHI *et al.*, 2012). Desta forma, este estudo tem como principal

objetivo avaliar os efeitos da suplementação com antioxidantes e IGF-I, nas diferentes etapas da PIV, sobre o desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos.

5. CONCLUSÃO

A adição de IGF-1 durante o CIV aumentou a resistência de blastocistos bovinos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona, visto que aumentou a expressão do gene antioxidante SOD-1, o que refletiu em redução da apoptose e do impacto sobre o desenvolvimento e criotolerância embrionários.

REFERÊNCIAS

ADLER, V.; Y, Z.; TEW, K.D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, v. 18, p. 6104-6111, 1999.

AMIN, A.; GAD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; PRASTOWO, S.; HELD, E.; HOELKER, M.; RINGS, F.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediates oxidative-stress-response pathway. **Mol. Reprod. Dev.**, v.81, p.497-513, 2014.

ASSIS, P.M.; CASTRO, L.S.; SIQUEIRA, A.F.P.; DELGADO, J.C.; HAMILTON, T.R.S.; GOISSIS, M.D.; MENDES, C.M.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. System for evaluation of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, p. 577-580, 2015.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p.939-949, 2003.

BAIN, N.T.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.23, p.561-575, 2011.

BLOCK, J; WRENZYCHI, C.; NIEMANN, H.; HERRMANN, D.; HANSEN, P.J. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reprod. and Develop.**, v.75, p.895-903, 2008.

CAGNONE, G.L.M.; SIRARD, M. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. **Mol. Reprod. Dev.**, v.80, p.297-314, 2013.

CÁNEPA, M.J.; ORTEGA, N.M.; MONTELEONE, M.C.; MUCCI, N.; KAISER, G.G.; BROCCO, M.; MUTTO, A. Expression profile of genes as indicators of developmental competence and quality of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine embryos. **Plos One**, v. 9, p. 1-8, 2014.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1420-1425, 1997.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. **Reprod. Dom. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.

FEUGANG, J.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; SAYOUD, H.; REES, J.F.; PAMPFER, S.; MOENS, A.; et al. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote.**, v.11, p.107-125, 2003.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. **Free Rad. Biol. Med.** **15**, 69–75.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.EL.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

HARVEY, M.B.; ARCELLANA-PANLILIO, M.Y.; ZHANG, X.; SCHULTZ, G.A.; WATSON, A.J. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo co-cultured. **Biol. Reprod.**, v.53, p.532-572, 1995.

IMAI, K.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. **Theriogenology**, v.64, n.10, p.887-891, 2002.

JOHNSON, M.H.; NARS-ESFAHANI, M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? **Bioessays**, v.16, p.31-39, 1994.

JOUSAN, F.D.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 74, p. 189–196, 2007.

KITAGAWA, Y.; SUZUKIB, K.; YONEDAA, A.; WATANABEA, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1186-1283, 2004.

KORKONEN, K.; JULKUNEN, K.; BREDBACKA, P.; TIIRIKKA, T.; RÄTY, M.; VARTIA, K.; KAIMIO, I.; KONTINEN, A.; HALMEKYTÖ, M.; VIKKI, J.; PEIPPO, J.; LINDEBERG, H. The effect of ascorbic acid during biopsy and cryopreservation on viability of bovine embryos produced in vivo. **Theriogenology**, v. 77, p. 201-205, 2012.

KURZAWA, R.; GLABOWSKI, W.; BACZKOWSKI, T.; BRELIK, P. Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium. **Reprod Biol**, v.2, p.143–162, 2002.

KUZMANY, A.; HAVLICEK, V.; WRENZYCKI, C.; WILKENING, S.; BREM, G.; BESENFELDER, U. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultures under different conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 482-494, 2011.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmatic glutathione concentration and the role of beta-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.20, p.407-423, 1996.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 38, p. 259-267, 2003.

LOOR, G.; KONDAPALLI, J.; SCHRIEWER, J.M.; CHANDEL, N.S.; VANDEN HOEK, T.L.; SCHUMACKER, P.T. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1925-1936, 2010.

LOTT, W.M.; ANCHAMPARUTHY, V.M.; MCGILLIARD, M.L.; MULLARKY, I.K.; AND GWAZDAUSKAS, F.C. Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development of *in vitro*-produced bovine embryos. **Reprod. Dom. Anim.**, v.46, p.585-594, 2010.

MATWEE, C.; BETTS, D.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57-68, 2000.

MONKS, T.J.; HANZLIK, R.P.; COHEN, G.M.; ROSS, D.; GRAHAM, D.G. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 112, p.2-16, 1992.

MOSS, J.I.; PONTES, E.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. **Arch. Toxicol.**, v.83, p.1001-1007, 2009.

NEDAMBALE, T.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Anim. Reprod. Sci.**, v.93, p.61-75, 2006.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.**, v.38, p.1171-1188, 1988.

SALZANO, A.; ALBERO, G.; ZULLO, G.; NEGLIA, G.; ABDEL-WAHAB, A.; BIFULCO, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 151, p. 91-96, 2014.

SEIDEL, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W.B.; SIQUEIRA, A.F.P.; NICHI, M.; PAULA-LOPES, F.F.; MARQUES, M.G.; PERES, M.A.; BARNABE, V.H.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. **Reproduction**, v. 146, p.433-441, 2013.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.1-9, 2012.

TVRDÁ, E.; KNAZICKÁ, Z.; BÁRDOS, L.; MASSÁNYI, P.; LUKÁC, N. Impact of oxidative stress on male fertility – a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.59, p.465-484, 2011.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T.T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v.52, p.939-948, 1999.

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.G.D.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine *in vitro* produced embryos of different developmental capacity. **Reproduction**, v.133, p. 709-718, 2007.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A. JR., SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum Reprod**, v.16, p. 893–901, 2001.

WRIGHT, J.M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 4ª Edição, p. 165-168, 2009.

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Mol Biol**, v. 80, p. 75-84, 2012.